

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

[*Seal of the  
Russian Federation*]

(19) RU (11) 2,071,503 (13) C1  
(51) 6 C 12 N 15/70, 15/09

Russian Federation Committee  
for Patents and Trademarks

**(12) SPECIFICATION OF INVENTION  
for a Russian Federation Patent**

---

(21) 5027679/13 (22) February 18, 1992  
 (46) January 10, 1997, Bulletin No. 1  
 (72) V. Ye. Alatortsev and G. I. Alatortseva  
 (71) (73) The Bioservis Biotechnology Company  
 (56) *The EMBO Journal*, Vol. 3, pp. 1429–1434, 1984.  
 (54) THE pEL5c VECTOR FOR EXPRESSION OF FOREIGN DNA  
 (57) The invention relates to the field of biotechnology, particularly genetic engineering, and can be used in creating plasmids and corresponding strains that produce recombinant proteins, and also to purify protein products. The advantage of the pEL5c vector filed for is that as a result of the use of an operon consisting of a gene that codes for a recombinant protein and the lysozyme gene, the synthesis of lysozyme, which ruptures the polysaccharide membrane of *E. coli*, significantly simplifying the purification of the water-insoluble agglomerate of recombinant protein, proceeds concurrently with the synthesis of the recombinant protein.

---

The invention relates to the fields of biotechnology and genetic engineering, and can be used to produce plasmids that synthesize recombinant proteins.

Large quantities of recombinant proteins can be synthesized in *Escherichia coli* cells, which carry systems for the expression of recombinant genes on the basis of lambda-phage promoters (see, e.g., H. Bernard and D. R. Helinski, *Methods Enzymol.*, Vol. 68, pp. 482–492, 1979). In such systems transcription is regulated by the binding of the lambda-phage temperature-sensitive repressor, which is coded by the mutant gene *clts857*, to an operator segment. When the cells grow at a temperature of 30–32°C, the repressor binds to the operator and blocks expression. As the temperature increases to 42°C the repressor is inactivated, allowing the

RNA polymerase to bind with the promoter and to commence transcription of the gene. As a result of intensive transcription and subsequent translation, significant quantities of protein can be synthesized.

The recombinant plasmid DNAs pEX1, pEX2, and pEX3 are known which make it possible to express recombinant proteins in all three reading frames (K. K. Stanley and J. P. Luzio, *The EMBO Journal*, Vol. 3, pp. 1429–1434, 1984). The DNA sequences for expression can be inserted in the poly-linker located at the 3'-terminus of the lacZ gene. In the indicated plasmids the lambda-bacteriophage promoter  $P_R$  effects expression of the DNA sequence, and the product constitutes a significant part of the total bacterial protein. The expressed protein accumulates in the cell in the form of water-insoluble agglomerates.

However, these vectors have a drawback: the bacterial cell wall must be ruptured in order to release the water-insoluble agglomerates of the recombinant protein.

The pEX3 vector was selected as the prototype for producing the pEL5c vector. The advantage of the pEL5c vector filed for is that as a result of the use of an operon consisting of a gene that codes for the recombinant protein and the lysozyme gene, the synthesis of lysozyme, which ruptures the polysaccharide membrane of *E. coli*, significantly simplifying the purification of the water-insoluble agglomerates of recombinant protein, proceeds concurrently with the synthesis of the recombinant protein.

The essence of the invention is that the pEL5c vector 6.4 kilobase pairs (kbp) long consisting of the following elements has been constructed:

- the XbaI–XbaI fragment 5.8 kbp long of the plasmid DNA of the bacterial vector pEX3, which contains the cro-lacZ fusion gene, which codes for the fusion protein under the control of the lambda-bacteriophage promoter  $P_R$ , and a polylinker at the 3'-terminus of the lacZ gene; and
- the BamHI–BamHI fragment 0.6 kbp long of pLysS plasmid DNA (A. C. Y. Chang and S. N. Cohen, *J. Bacteriol.*, Vol. 134, p. 1141, 1978), which contains the bacteriophage T4 lysozyme gene.

To construct the pEL5c plasmid, the pEX3 plasmid DNA is hydrolyzed with XbaI restriction enzyme and three nucleotides are added at each sticky end by means of PolIK DNA polymerase. The BamHI restriction enzyme 0.6 kbp long from the pLysS plasmid (A. C. Y. Chang and S. N. Cohen, *J. Bacteriol.*, Vol. 134, p. 1141, 1978), which contains the bacteriophage T4 lysozyme gene and which has three nucleotides added on at each sticky end by means of PolIK, is produced in parallel. The pEX2 fragment is ligated to the DNA

fragment containing the bacteriophage T4 lysozyme gene. The ligase mixture transforms *E. coli* cells that contain in a chromosome the lambda-bacteriophage temperature-sensitive gene clts857, such as a cell of strain PLT90. The transformants are plated out onto a medium with ampicillin at 30°C. Clones containing recombinant plasmids with the lysozyme gene in the proper orientation are selected by analyzing for the ability to lyse after induction of protein synthesis. Expression of the recombinant proteins is induced by increasing the temperature to 42°C. In the lysozyme-producing clones, the cells lyse after protein-synthesis induction and the subsequent addition of chloroform. Standard methods are used to isolate the pEL5c plasmid from the selected clones. The vector DNA is stable in storage in 10 mM *tris*, pH 8.0, 1 mM EDTA at -20°C.

*Example 1.* Production of the pEL5c vector plasmid with an operon system for expression and lysis.

Cells of *E. coli* PLT90 bacteria containing the pEX3 plasmid (K. K. Stanley and J. P. Luzio, *The EMBO Journal*, Vol. 3, pp. 1429-1434, 1984) are grown in 50 ml of 2YT broth (16 g of tryptone, 10 g of yeast extract, and 5 g of NaCl per liter of water) containing 100 µg/ml of ampicillin to a titer of 10<sub>9</sub> [sic] cells/ml.

The cells are precipitated by centrifugation, resuspended in 2 ml of solution (50 mM of glucose, 25 mM of *tris*-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 5 mg/ml of lysozyme), and incubated for 5 min at room temperature. Then 4 ml of a solution of 0.2 M NaOH and 1% sodium dodecylsulfate is added, [and the resulting fluid] is stirred and incubated for 10 min in ice; 3 ml of a cooled 5 M potassium acetate solution with pH 4.8 is added, stirred, and left for 10 min in ice; the precipitate formed is separated by centrifugation. A quantity of 0.6 volume of isopropyl alcohol is added to the supernatant, and [the resulting fluid] is held for 15 min at room temperature. The precipitate is collected by centrifugation, resuspended in 0.5 ml of TE8 buffer (10 mM *tris*-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA), and an equal volume of a saturated sodium acetate solution is added. After incubation for 30 min at -20°C, the precipitate is removed by centrifugation, and 0.6 volume of isopropanol is added to the supernatant and [the resulting fluid is] left for 1 hr at room temperature. The precipitate is collected by centrifugation, washed with 70% ethanol, and resuspended in 100 µl of TE8 buffer.

The plasmid DNA (1 µg of pEX3) is treated with XbaI restriction endonuclease (10 units) in buffer A (50 mM of *tris*-HCl, pH 7.6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothreitol, 100 mM NaCl, 4 mM spermidine) for 2 hr. The completeness of hydrolysis is analyzed by electrophoresis. By using the

Klenow fragment of *E. coli* DNA polymerase, three of the four nucleotides are added at the sticky *Xba*I ends. The proteins are removed by phenol extraction, and the DNA is precipitated with ethanol and resuspended in 5  $\mu$ l of TE8.

To obtain the DNA fragment with the lysozyme gene, restriction is performed on 10  $\mu$ g of the pLysS plasmid DNA (A. C. Y. Chang and S. N. Cohen, *J. Bacteriol.*, Vol. 134, p. 1141, 1978) with *Bam*HI restriction. The Klenow fragment of *E. coli* DNA polymerase is used to add three of the four nucleotides at the sticky *Bam*HI ends. The *-Bam*HI-*Bam*HI- fragment 0.6 kbp long with partially added sticky ends is separated by means of electrophoresis using sorption on DY81 paper. The paper is washed, incubated for 30 min at 80°C in a buffer of 2 M sodium acetate, 50 mM *tris*-HCl, pH 7.5, and 10 mM EDTA. The DNA that has passed into the solution is removed from the paper by centrifugation, and 2 volumes of ethanol is added to the solution. After incubation at -20°C for 1 hr, the precipitate is collected by centrifugation and dissolved in 5  $\mu$ l of TE8 buffer.

A quantity of 0.5  $\mu$ g of a fragment of the pEX3 vector DNA is mixed with 0.2  $\mu$ g of DNA containing the bacteriophage T4 lysozyme gene. The fragments are linked by using 10 units of phage T4 DNA ligase in a buffer of 30 mM *tris*-HCl, pH 7.2, 10 mM magnesium chloride, 2 mg/ml of gelatin, 1 mM spermidine, 0.1% mercaptoethanol, and 0.2 mM ATP at 20°C for 2 hr.

The resulting mixture is used to transform *E. coli* PLT90 cells containing clts857 repressor. To do this, an overnight cell culture is cultivated on LB medium with 10 mM MgSO<sub>4</sub> in a ratio of 1:100 and grown with aeration to a density A550 = 0.3 relative units. After 15 min of cooling at 0°C, the cells are collected by centrifugation, suspended in one-third the original volume with a buffer of 30 mM potassium acetate, pH 5.8, 100 mM RbCl, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, and 15% glycerol, and left 30–60 min on ice. The cells are collected by centrifugation, resuspended in 1/12.5th the original volume in a buffer of 10 mM MOPS, pH 6.8, containing 10 mM RbCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, and 15% glycerol, and incubated for 15 min on ice. Ligated DNA fragments are added to the cell suspension, [the suspension] is incubated for 40 min at 0°C and then for 2 min at 34°C and for 2–3 min at 0°C, diluted 5 times with 2YT medium, grown for 30 min at 30°C, and plated out onto agar medium 2YT with ampicillin (50 mg/ml).

Clones containing recombinant plasmids with the lysozyme gene in the proper orientation are selected by analysis for the ability to lyse after induction of protein synthesis. Expression of the recombinant proteins is induced by increasing the temperature to 42°C. The cells lyse in the lysozyme-

producing clones after induction of protein synthesis and subsequent addition of chloroform. The pEL5c plasmid is separated from the selected clones by standard methods. The vector DNA is stable in storage in 10 mM *tris*, pH 8.0, 1 mM EDTA at -20°C.

*Example 2.* Use of the pEL5c vector to produce recombinant proteins in the form of water-insoluble agglomerates.

PLT90 cells containing the pEL5c plasmid are inoculated into 1 ml of LB medium with 100 µg/ml of ampicillin, and grown at 30°C overnight. The overnight culture is cultivated in 2 ml of the same medium in a ratio of 1:100 and grown with aeration to 0.2 relative units at 550 nm; then the temperature is increased to 42°C to induce synthesis of the fusion protein, and [the culture] is grown for 2 hr more. Then chloroform is added to 1%, and incubation is performed at 37°C for another hour. Then the lysate is centrifuged, the precipitate is resuspended in 75 µl of TE8 buffer, and an equal volume of buffer is added for electrophoresis (160 mM *tris*-HCl, pH 6.8, 20% glycerol, 4% sodium dodecylsulfate, 4 mM EDTF,\* 6% mercaptoethanol, and 0.05% bromophenol blue). The cellular proteins are analyzed by electrophoresis in a polyacrylamide gel after Lamml (U. K. Lamml, *Nature*, Vol. 227, pp. 680-685, 1970). After the completion of electrophoresis, the proteins in the gene are fixed and stained with Coomassie brilliant blue R-250.

Analysis of the results shows that as a result of the action of lysozyme, the bacterial wall ruptures and the water-soluble cellular proteins are released into the medium, as evidenced in the extinction of minor protein bands. There is no such effect in the control in the case where the pEX3 plasmid is used.

Thus, the invention makes it possible to produce water-insoluble agglomerates of recombinant proteins without the use of additional techniques of cell-wall rupture.

## CLAIMS

The pEL5c vector, which is intended to express foreign DNA, is 6.4 kbp long, and contains the XbaI-XbaI fragment 5.8 kbp long of the plasmid DNA of the bacterial vector pEX3, with the cro-lacZ fusion gene, which codes for a protein under the control of the lambda-bacteriophage promoter  $P_R$ ; a polylinker at the 3'-terminus of the lacZ gene; the BamHI-BamHI fragment 0.6 kbp long of pLysS plasmid DNA with the bacteriophage T4

---

\* Translator's note: The Russian acronym "EDTF" has no known expansion, but differs only in the last letter from "EDTA." Perhaps "EDTF" is simply a typographical error.

lysozyme gene; unique restriction sites for cloning of DNA on the 3'-terminus of the lacZ gene: SmaI, BamHI, SalI, and PstI; the lambda bacteriophage operator  $O_R$  and promoter  $P_R$ ; the phage fd transcription terminators; a genetic marker — for resistance to ampicillin; and a range of hosts — *Escherichia coli* bacteria, with the lambda bacteriophage clts 857 gene.

---

*[Translator's note: Miscellaneous publication data at the end of the patent are not translated here.]*



(19) RU (11) 2071503 (3) CI

(51) 6 C 12 N 15/70, 15/09

Комитет Российской Федерации  
по патентам и товарным знакам

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**  
к патенту Российской Федерации

1  
(21) 5027679/13 (22) 18.02.92  
(46) 10.01.97 Бюл. № 1  
(72) Алаторцев В.Е., Алаторцева Г.И.  
(71) (73) Биотехнологическая компания  
"Биосервис"  
(56) The EMBO Journal, v.3, pp. 1429-1434,  
1984.  
(54) ВЕКТОР pEL5C, ПРЕДНАЗНАЧЕН-  
НЫЙ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ЧУЖЕРОДНОЙ  
ДНК  
(57) Изобретение относится к области био-  
технологии, и в частности к генетической  
инженерии, и может быть использовано

2  
при создании плазмид и соответствующих  
штаммов-продуцентов рекомбинантных бел-  
ков, а также для очистки белковых про-  
дуктов. Преимущество заявленного вектора  
pEL5c заключается в том, что в результа-  
те использования оперона, состоящего из  
гена, кодирующего рекомбинантный белок,  
и гена лизоцима, одновременно с синтезом  
рекомбинантного белка идет синтез лизо-  
цима, разрушающего полисахаридную об-  
олочку E.coli, что существенно упрощает  
очистку водонерастворимого агломерата ре-  
комбинантного белка.

RU

2071503

CI

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100  
101  
102  
103  
104  
105  
106  
107  
108  
109  
110  
111  
112  
113  
114  
115  
116  
117  
118  
119  
120  
121  
122  
123  
124  
125  
126  
127  
128  
129  
130  
131  
132  
133  
134  
135  
136  
137  
138  
139  
140  
141  
142  
143  
144  
145  
146  
147  
148  
149  
150  
151  
152  
153  
154  
155  
156  
157  
158  
159  
160  
161  
162  
163  
164  
165  
166  
167  
168  
169  
170  
171  
172  
173  
174  
175  
176  
177  
178  
179  
180  
181  
182  
183  
184  
185  
186  
187  
188  
189  
190  
191  
192  
193  
194  
195  
196  
197  
198  
199  
200  
201  
202  
203  
204  
205  
206  
207  
208  
209  
210  
211  
212  
213  
214  
215  
216  
217  
218  
219  
220  
221  
222  
223  
224  
225  
226  
227  
228  
229  
230  
231  
232  
233  
234  
235  
236  
237  
238  
239  
240  
241  
242  
243  
244  
245  
246  
247  
248  
249  
250  
251  
252  
253  
254  
255  
256  
257  
258  
259  
250  
251  
252  
253  
254  
255  
256  
257  
258  
259  
260  
261  
262  
263  
264  
265  
266  
267  
268  
269  
270  
271  
272  
273  
274  
275  
276  
277  
278  
279  
280  
281  
282  
283  
284  
285  
286  
287  
288  
289  
280  
281  
282  
283  
284  
285  
286  
287  
288  
289  
290  
291  
292  
293  
294  
295  
296  
297  
298  
299  
290  
291  
292  
293  
294  
295  
296  
297  
298  
299  
300  
301  
302  
303  
304  
305  
306  
307  
308  
309  
3010  
3011  
3012  
3013  
3014  
3015  
3016  
3017  
3018  
3019  
3020  
3021  
3022  
3023  
3024  
3025  
3026  
3027  
3028  
3029  
3030  
3031  
3032  
3033  
3034  
3035  
3036  
3037  
3038  
3039  
3040  
3041  
3042  
3043  
3044  
3045  
3046  
3047  
3048  
3049  
3050  
3051  
3052  
3053  
3054  
3055  
3056  
3057  
3058  
3059  
3060  
3061  
3062  
3063  
3064  
3065  
3066  
3067  
3068  
3069  
3070  
3071  
3072  
3073  
3074  
3075  
3076  
3077  
3078  
3079  
3080  
3081  
3082  
3083  
3084  
3085  
3086  
3087  
3088  
3089  
3090  
3091  
3092  
3093  
3094  
3095  
3096  
3097  
3098  
3099  
3010  
3011  
3012  
3013  
3014  
3015  
3016  
3017  
3018  
3019  
3020  
3021  
3022  
3023  
3024  
3025  
3026  
3027  
3028  
3029  
3030  
3031  
3032  
3033  
3034  
3035  
3036  
3037  
3038  
3039  
3030  
3031  
3032  
3033  
3034  
3035  
3036  
3037  
3038  
3039  
3040  
3041  
3042  
3043  
3044  
3045  
3046  
3047  
3048  
3049  
3040  
3041  
3042  
3043  
3044  
3045  
3046  
3047  
3048  
3049  
3050  
3051  
3052  
3053  
3054  
3055  
3056  
3057  
3058  
3059  
3050  
3051  
3052  
3053  
3054  
3055  
3056  
3057  
3058  
3059  
3060  
3061  
3062  
3063  
3064  
3065  
3066  
3067  
3068  
3069  
3060  
3061  
3062  
3063  
3064  
3065  
3066  
3067  
3068  
3069  
3070  
3071  
3072  
3073  
3074  
3075  
3076  
3077  
3078  
3079  
3070  
3071  
3072  
3073  
3074  
3075  
3076  
3077  
3078  
3079  
3080  
3081  
3082  
3083  
3084  
3085  
3086  
3087  
3088  
3089  
3080  
3081  
3082  
3083  
3084  
3085  
3086  
3087  
3088  
3089  
3090  
3091  
3092  
3093  
3094  
3095  
3096  
3097  
3098  
3099  
3010  
3011  
3012  
3013  
3014  
3015  
3016  
3017  
3018  
3019  
3020  
3021  
3022  
3023  
3024  
3025  
3026  
3027  
3028  
3029  
3030  
3031  
3032  
3033  
3034  
3035  
3036  
3037  
3038  
3039  
3040  
3041  
3042  
3043  
3044  
3045  
3046  
3047  
3048  
3049  
3040  
3041  
3042  
3043  
3044  
3045  
3046  
3047  
3048  
3049  
3050  
3051  
3052  
3053  
3054  
3055  
3056  
3057  
3058  
3059  
3050  
3051  
3052  
3053  
3054  
3055  
3056  
3057  
3058  
3059  
3060  
3061  
3062  
3063  
3064  
3065  
3066  
3067  
3068  
3069  
3060  
3061  
3062  
3063  
3064  
3065  
3066  
3067  
3068  
3069  
3070  
3071  
3072  
3073  
3074  
3075  
3076  
3077  
3078  
3079  
3070  
3071  
3072  
3073  
3074  
3075  
3076  
3077  
3078  
3079  
3080  
3081  
3082  
3083  
3084  
3085  
3086  
3087  
3088  
3089  
3080  
3081  
3082  
3083  
3084  
3085  
3086  
3087  
3088  
3089  
3090  
3091  
3092  
3093  
3094  
3095  
3096  
3097  
3098  
3099  
3010  
3011  
3012  
3013  
3014  
3015  
3016  
3017  
3018  
3019  
3020  
3021  
3022  
3023  
3024  
3025  
3026  
3027  
3028  
3029  
3030  
3031  
3032  
3033  
3034  
3035  
3036  
3037  
3038  
3039  
3040  
3041  
3042  
3043  
3044  
3045  
3046  
3047  
3048  
3049  
3040  
3041  
3042  
3043  
3044  
3045  
3046  
3047  
3048  
3049  
3050  
3051  
3052  
3053  
3054  
3055  
3056  
3057  
3058  
3059  
3050  
3051  
3052  
3053  
3054  
3055  
3056  
3057  
3058  
3059  
3060  
3061  
3062  
3063  
3064  
3065  
3066  
3067  
3068  
3069  
3060  
3061  
3062  
3063  
3064  
3065  
3066  
3067  
3068  
3069  
3070  
3071  
3072  
3073  
3074  
3075  
3076  
3077  
3078  
3079  
3070  
3071  
3072  
3073  
3074  
3075  
3076  
3077  
3078  
3079  
3080  
3081  
3082  
3083  
3084  
3085  
3086  
3087  
3088  
3089  
3080  
3081  
3082  
3083  
3084  
3085  
3086  
3087  
3088  
3089  
3090  
3091  
3092  
3093  
3094  
3095  
3096  
3097  
3098  
3099  
3010  
3011  
3012  
3013  
3014  
3015  
3016  
3017  
3018  
3019  
3020  
3021  
3022  
3023  
3024  
3025  
3026  
3027  
3028  
3029  
3030  
3031  
3032  
3033  
3034  
3035  
3036  
3037  
3038  
3039  
3040  
3041  
3042  
3043  
3044  
3045  
3046  
3047  
3048  
3049  
3040  
3041  
3042  
3043  
3044  
3045  
3046  
3047  
3048  
3049  
3050  
3051  
3052  
3053  
3054  
3055  
3056  
3057  
3058  
3059  
3050  
3051  
3052  
3053  
3054  
3055  
3056  
3057  
3058  
3059  
3060  
3061  
3062  
3063  
3064  
3065  
3066  
3067  
3068  
3069  
3060  
3061  
3062  
3063  
3064  
3065  
3066  
3067  
3068  
3069  
3070  
3071  
3072  
3073  
3074  
3075  
3076  
3077  
3078  
3079  
3070  
3071  
3072  
3073  
3074  
3075  
3076  
3077  
3078  
3079  
3080  
3081  
3082  
3083  
3084  
3085  
3086  
3087  
3088  
3089  
3080  
3081  
3082  
3083  
3084  
3085  
3086  
3087  
3088  
3089  
3090  
3091  
3092  
3093  
3094  
3095  
3096  
3097  
3098  
3099  
3010  
3011  
3012  
3013  
3014  
3015  
3016  
3017  
3018  
3019  
3020  
3021  
3022  
3023  
3024  
3025  
3026  
3027  
3028  
3029  
3030  
3031  
3032  
3033  
3034  
3035  
3036  
3037  
3038  
3039  
3040  
3041  
3042  
3043  
3044  
3045  
3046  
3047  
3048  
3049  
3040  
3041  
3042  
3043  
3044  
3045  
3046  
3047  
3048  
3049  
3050  
3051  
3052  
3053  
3054  
3055  
3056  
3057  
3058  
3059  
3050  
3051  
3052  
3053  
3054  
3055  
3056  
3057  
3058  
3059  
3060  
3061  
3062  
3063  
3064  
3065  
3066  
3067  
3068  
3069  
3060  
3061  
3062  
3063  
3064  
3065  
3066  
3067  
3068  
3069  
3070  
3071  
3072  
3073  
3074  
3075  
3076  
3077  
3078  
3079  
3070  
3071  
3072  
3073  
3074  
3075  
3076  
3077  
3078  
3079  
3080  
3081  
3082  
3083  
3084  
3085  
3086  
3087  
3088  
3089  
3080  
3081  
3082  
3083  
3084  
3085  
3086  
3087  
3088  
3089  
3090  
3091  
3092  
3093  
3094  
3095  
3096  
3097  
3098  
3099  
3010  
3011  
3012  
3013  
3014  
3015  
3016  
3017  
3018  
3019  
3020  
3021  
3022  
3023  
3024  
3025  
3026  
3027  
3028  
3029  
3030  
3031  
3032  
3033  
3034  
3035  
3036  
3037  
3038  
3039  
3040  
3041  
3042  
3043  
3044  
3045  
3046  
3047  
3048  
3049  
3040  
3041  
3042  
3043  
3044  
3045  
3046  
3047  
3048  
3049  
3050  
3051  
3052  
3053  
3054  
3055  
3056  
3057  
3058  
3059  
3050  
3051  
3052  
3053  
3054  
3055  
3056  
3057  
3058  
3059  
3060  
3061  
3062  
3063  
3064  
3065  
3066  
3067  
3068  
3069  
3060  
3061  
3062  
3063  
3064  
3065  
3066  
3067  
3068  
3069  
3070  
3071  
3072  
3073  
3074  
3075  
3076  
3077  
3078  
3079  
3070  
3071  
3072  
3073  
3074  
3075  
3076  
3077  
3078  
3079  
3080  
3081  
3082  
3083  
3084  
3085  
3086  
3087  
3088  
3089  
3080  
3081  
3082  
3083  
3084  
3085  
3086  
3087  
3088  
3089  
3090  
3091  
3092  
3093  
3094  
3095  
3096  
3097  
3098  
3099  
3010  
3011  
3012  
3013  
3014  
3015  
3016  
3017  
3018  
3019  
3020  
3021  
3022  
3023  
3024  
3025  
3026  
3027  
3028  
3029  
3030  
3031  
3032  
3033  
3034  
3035  
3036  
3037  
3038  
3039  
3040  
3041  
3042  
3043  
3044  
3045  
3046  
3047  
3048  
3049  
3040  
3041  
3042  
3043  
3044  
3045  
3046  
3047  
3048  
3049  
3050  
3051  
3052  
3053  
3054  
3055  
3056  
3057  
3058  
3059  
3050  
3051  
3052  
3053  
3054  
3055  
3056  
3057  
3058  
3059  
3060  
3061  
3062  
3063  
3064  
3065  
3066  
3067  
3068  
3069  
3060  
3061  
3062  
3063  
3064  
3065  
3066  
3067  
3068  
3069  
3070  
3071  
3072  
3073  
3074  
3075  
3076  
3077  
3078  
3079  
3070  
3071  
3072  
3073  
3074  
3075  
3076  
3077  
3078  
3079  
3080  
3081  
3082  
3083  
3084  
3085  
3086  
3087  
3088  
3089  
3080  
3081  
3082  
3083  
3084  
3085  
3086  
3087  
3088  
3089  
3090  
3091  
3092  
3093  
3094  
3095  
3096  
3097  
3098  
3099  
3010  
3011  
3012  
3013  
3014  
3015  
3016  
3017  
3018  
3019  
3020  
3021  
3022  
3023  
3024  
3025  
3026  
3027  
3028  
3029  
3030  
3031  
3032  
3033  
3034  
3035  
3036  
3037  
3038  
3039  
3040  
3041  
3042  
3043  
3044  
3045  
3046  
3047  
3048  
3049  
3040  
3041  
3042  
3043  
3044  
3045  
3046  
3047  
3048  
3049  
3050  
3051  
3052  
3053  
3054  
3055  
3056  
3057  
3058  
3059  
3050  
3051  
3052  
3053  
3054  
3055  
3056  
3057  
3058  
3059  
3060  
3061  
3062  
3063  
3064  
3065  
3066  
3067  
3068  
3069  
3060  
3061  
3062  
3063  
3064  
3065  
3066  
3067  
3068  
3069  
3070  
3071  
3072  
3073  
3074  
3075  
3076  
3077  
3078  
3079  
3070  
3071  
3072  
3073  
3074  
3075  
3076  
3077  
3078  
3079  
3080  
3081  
3082  
3083  
3084  
3085  
3086  
3087  
3088  
3089  
3080  
3081  
3082  
3083  
3084  
3085  
3086  
3087  
3088  
3089  
3090  
3091  
3092  
3093  
3094  
3095  
3096  
3097  
3098  
3099  
3010  
3011  
3012  
3013  
3014  
3015  
3016  
3017  
3018  
3019  
3020  
3021  
3022  
3023  
3024  
3025  
3026  
3027  
3028  
3029  
3030  
3031  
3032  
3033  
3034  
3035  
3036  
3037  
3038  
3039  
3040  
3041  
3042  
3043  
3044  
3045  
3046  
3047  
3048  
3049  
3040  
3041  
3042  
3043  
3044  
3045  
3046  
3047  
3048  
3049  
3050  
3051  
3052  
3053  
3054  
3055  
3056  
3057  
3058  
3059  
3050  
3051  
3052  
3053  
3054  
3055  
3056  
3057  
3058  
3059  
3060  
3061  
3062  
3063  
3064  
3065  
3066  
3067  
3068  
3069  
3060  
3061  
3062  
3063  
3064  
3065  
3066  
3067  
3068  
3069  
3070  
3071  
3072  
3073  
3074  
3075  
3076  
3077  
3078  
3079  
3070  
3071  
3072  
3073  
3074  
3075  
3076  
3077  
3078  
3079  
3080  
3081  
3082  
3083  
3084  
3085  
3086  
3087  
3088  
3089  
3080  
3081  
3082  
3083  
3084  
3085  
3086  
3087  
3088  
3089  
3090  
3091  
3092  
3093  
3094  
3095  
3096  
3097  
3098  
3099  
3010  
3011  
3012  
3013  
3014  
3015  
3016  
3017  
3018  
3019  
3020  
3021  
3022  
3023  
3024  
3025  
3026  
3027  
3028  
3029  
3030  
3031  
3032  
3033  
3034  
3035  
3036  
3037  
3038  
3039  
3040  
3041  
3042  
3043  
3044  
3045  
3046  
3047  
3048  
3049  
3040  
3041  
3042  
3043  
3044  
3045  
3046  
3047  
3048  
3049  
3050  
3051  
3052  
3053  
3054  
3055  
3056  
3057  
3058  
3059  
3050  
3051  
3052  
3053  
3054  
3055  
3056  
3057  
3058  
3059  
3060  
3061  
3062  
3063  
3064  
3065  
3066  
3067  
3068  
3069  
3060  
3061  
3062  
3063  
3064  
3065  
3066  
3067  
3068  
3069  
3070  
3071  
3072  
3073  
3074  
3075  
3076  
3077  
3078  
3079  
3070  
3071  
3072  
3073  
3074  
3075  
3076  
3077  
3078  
3079  
3080  
3081  
3082  
3083  
3084  
3085  
3086  
3087  
3088  
3089  
3080  
3

Изобретение относится к области биотехнологии, генетической инженерии и может быть использовано для получения плазмид, синтезирующих рекомбинантные белки.

Большие количества рекомбинантных белков можно синтезировать в клетках *Escherichia coli*, несущих системы экспрессии рекомбинантных генов на основе промоторов фага лямбда (см., например, H. Bernhard and D. R. Helinski. *Methods Enzymol.*, vol. 68, pp. 482-492, 1979). Транскрипция в таких системах регулируется связыванием температурочувствительного репрессора фага лямбда, кодируемого мутантным геном с *lts857*, с операторным участком. Когда клетки растут при температуре 30-32°C, репрессор связывается с оператором и блокирует экспрессию. При повышении температуры роста до 42°C репрессор инактивируется, что позволяет РНК-полимеразе связаться с промотором и начать транскрипцию гена. В результате итаксивной транскрипции и последующей трансляции могут синтезироваться значительные количества белка.

Известны рекомбинантные плазмидные ДНК *pEX1*, *pEX2* и *pEX3*, позволяющие экспрессировать рекомбинантные белки во всех трех рамках считывания (K. K. Stanley and J. P. Luzio. *The EMBO Journal*, vol.3, pp. 1429-1434, 1984). Последовательности ДНК для экспрессии можно вставить в полилинкер, расположенный в 3'-конце гена *lacZ*. В указанных плазмидах *P<sub>R</sub>* промотор бактериофага лямбда обеспечивает экспрессию последовательностей ДНК, и продукт составляет значительную часть суммарного бактериального белка. Экспрессируемый белок в клетках накапливается в виде водонерастворимых агломератов.

Однако у этих векторов есть недостаток: для выделения водонерастворимых агломератов рекомбинантного белка необходимо разрушать клеточную стенку бактерии.

Вектор *pEX3* выбран в качестве прототипа для получения вектора *pEL5c*. Преимущество заявленного вектора *pEL5c* заключается в том, что в результате использования оперона, состоящего из гена, кодирующего рекомбинантный белок, и гена лизоцима, одновременно с синтезом рекомбинантного белка идет синтез лизоцима, разрушающего полисахаридную оболочку *E.coli*, что существенно упрощает очистку водонерастворимых агломератов рекомбинантного белка.

Сущность изобретения состоит в том, что сконструирован вектор *pEL5c* размером 6,4

тысячи пар оснований (т.п.о.), состоящий из следующих элементов:

-*XbaI-XbaI*-фрагмента плазмидной ДНК бактериального вектора *pEX3* размером 5,8 т.п.о., который содержит слитный *cro-lacZ* ген, кодирующий слитный белок под контролем промотора *P<sub>R</sub>* бактериофага лямбда, полилинкер в 3'-конце *lacZ*-гена;

-*BamH1-BamH1*-фрагмента ДНК плазмиды *pLysS* (A.C.Y. Chang and S.N. Cohen. *J. Bacteriol.*, vol.134, pp.1141, 1978), содержащего ген лизоцима бактериофага T4 и имеющего размер 0,6 т.п.о.

Для конструирования плазмиды *pEL5c* ДНК плазмиды *pEX3* гидролизуют рестриктиазой *XbaI* и достранивают по три нуклеотида в липких концах с помощью ДНК-полимеразы *PoIK*. Параллельно получают *BamH1* рестрикт размером 0,6 т.п.о. из плазмиды *pLysS* (A.C.Y. Chang and S.N. Cohen. *J. Bacteriol.*, vol.134, pp.1141, 1978), содержащий ген лизоцима бактериофага T4 и имеющий три достроения с помощью *PoIK* нуклеотида в липких концах. Фрагмент *pEX2* лигируют с фрагментом ДНК, содержащим ген лизоцима бактериофага T4. Лигазной смесью трансформируют клетки *E.coli*, содержащие в хромосоме температурочувствительный ген бактериофага лямбда с *lts857*, например клетки штамма *PLT90*. Трансформанты высевают на среду с ампциллином при 30°C. Клоны, содержащие рекомбинантные плазмиды с геном лизоцима в нужной ориентации, отбирают с помощью анализа на способность к лизису после индукции синтеза белка. Экспрессию рекомбинантных белков индуцируют повышением температуры до 42°C. В клонах, производящих лизоцим, после индукции белкового синтеза и последующего добавления хлороформа происходит лизис клеток. Из отобранных клонов стандартными способами выделяют плазмиду *pEL5c*. Векторная ДНК стабильна при хранении в 10 мМ трис, pH 8,0 1 мМ ЭДТА при -20°C.

Пример 1. Получение векторной плазмиды *pEL5c* с оперонной системой экспрессии и лизиса.

Клетки бактерий *E.coli* *PLT90*, содержащие плазмиду *pEX3* (K. K. Stanley and J. P. Luzio. *The EMBO Journal*, vol.3, pp. 1429-1434, 1984), выращивают в 50 мл бульона 2YT (16 г триптона, 10 г дрожжевого экстракта, 5 г *NaCl* на 1 л воды), содержащем 100 мкг/мл ампциллина до титра 10<sup>9</sup> кл/мл.

Клетки осаждают центрифугированием, ресусцируют в 2 мл раствора (50 мМ

глюкозы, 25 мМ трис-HCl, pH 8,0, 10 мМ ЭДТА, 5 мг/мл лизоцима) и инкубируют 5 мин при комнатной температуре. Далее добавляют 4 мл раствора 0,2 М NaOH, 1% додецилсульфата натрия, перемешивают, инкубируют 10 мин во льду, добавляют 3 мл охлажденного 5 М раствора ацетата калия, pH 4,8, перемешивают, оставляют на 10 мин во льду, образовавшийся осадок отделяют центрифугированием. К надосадочной жидкости добавляют 0,6 объема изопропилового спирта и выдерживают 15 мин при комнатной температуре. Осадок собирают центрифугированием, ресуспензируют в 0,5 мл TE8-буфера (10 мМ трис-HCl, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА) и добавляют равный объем насыщенного раствора ацетата натрия. После инкубации в течение 30 мин при минус 20°C осадок удаляют центрифугированием, а к надосадочной жидкости добавляют 0,6 объема изопропанола и оставляют на 1 час при комнатной температуре. Осадок собирают центрифугированием, промывают 70%-ным этанолом и ресуспензируют в 100 мкл TE8-буфера.

Плазмидную ДНК (1 мкг pEX3) обрабатывают эндонуклеазой рестрикции *Xba*I (10 ед.) в буфере А (50 мМ Трис-HCl, pH 7,6, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ дитиотреитол, 100 мМ NaCl, 4 мМ спермидина) в течение 2 часов. Анализ полноты гидролиза проводят с помощью электрофореза. Используя фрагмент Кленова ДНК-полимеразы *E.coli*, достраивают три из четырех нуклеотидов в липких *Xba*I-концах. Белки удаляют фенольной экстракцией, ДНК осаждают этанолом и ресуспензируют в 5 мкл TE8.

Для получения фрагмента ДНК с геном лизоцима проводят рестрикцию 10 мкг ДНК плазмиды pLysS (A.C.Y. Chang and S.N. Cohen. J. Bacteriol. vol.134, pp.1141, 1978) рестриктазой *Bam*H1. С помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы *E.coli* достраивают три из четырех нуклеотидов в липких *Bam*H1-концах. Фрагмент -*Bam*H1-*Bam*H1- с частично достроенными липкими концами размером 0,6 т.п.о. выделяют с помощью электрофореза сорбцией на бумагу DE81. Бумагу промывают, инкубируют 30 мин при 80°C в буфере 2 М ацетата натрия, 50 мМ трис-HCl, pH 7,5, 10 мМ ЭДТА. ДНК, перешедшую в раствор, удаляют с бумаги центрифугированием, к раствору добавляют 2 объема этанола. После инкубации при -20°C в течение часа осадок собирают центрифугированием и растворяют в 5 мкл буфера TE8.

0,5 мкг фрагмента ДНК вектора pEX3 смешивают с 0,2 мкг ДНК, содержащей ген

лизоцима бактериофага T4. Соединенные фрагменты проводят с помощью 10 ед. ДНК-лигазы фага T4 в буфере: 30 мМ трис-HCl pH 7,2, 10 мМ хлористого магния, 2 мг/мл желатины, 1 мМ спермидина 0,1%-меркаптоэтанола, 0,2 мМ АТФ при 20°C в течение 2 часов.

Полученной смесью трансформируют клетки *E.coli* PLT90, содержащие Clt857 рецессор. Для этого ночную культуру клеток разводят средой LB с 10 мМ MgSO<sub>4</sub> в соотношении 1:100 и растят с аэрацией до плотности A550-0,3 ОЕ. После 15 мин охлаждения при 0°C клетки собирают центрифугированием, супензируют в 1/3 первоначального объема буфером 30 мМ ацетата калия, pH 5,8, 100 мМ RbCl, 50 мМ MnCl<sub>2</sub>, 10 мМ CaCl<sub>2</sub>, 15% глицерина и оставляют на 30-60 мин на льду. Клетки собирают центрифугированием, ресуспензируют в 1/12,5 первоначального объема в буфере 10 мМ MOPS, pH 6,8, содержащем 10 мМ RbCl, 75 мМ CaCl<sub>2</sub>, 15% глицерина и инкубируют 15 мин на льду. К супензии клеток добавляют лигированные фрагменты ДНК, инкубируют 40 мин при 0°C, затем 2 мин при 34°C, 2-3 мин при 0°C, разбавляют в 5 раз средой 2YT, растят 30 мин при 30°C и высевают на агаризованную среду 2YT с ампидиллином (50 мг/мл).

Клоны, содержащие рекомбинантные плазмиды с геном лизоцима в нужной ориентации, отбирают с помощью анализа на способность к лизису после индукции синтеза белка. Экспрессию рекомбинантных белков индуцируют повышением температуры до 42°C. В клонах, продуцирующих лизоцим, после индукции белкового синтеза и последующего добавления хлороформа происходит лизис клеток. Из отобранных клонаов стандартными способами выделяют плазмиду pEL5c. Векторная ДНК стабильна при хранении в 10 мМ трис, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА при -20°C.

Пример 2. Использование вектора pEL5c для получения рекомбинантных белков в виде водонерастворимых агломератов.

Клетки PLT90, содержащие плазмиду pEL5c, инокулируют в 1 мл среды LB со 100 мкг/мл ампидиллина и растят ночь при 30°C. Ночную культуру разводят в 2 мл этой же среды в соотношении 1:100 и растят с аэрацией до 0,2 ОЕ при 550 нм, затем повышают температуру до 42°C для индукции синтеза слитного белка и растят еще 2 часа. Затем добавляют хлороформ до 1% и инкубируют при 37°C еще час. Далее лизят центрифугируют, ресуспензируют осадок в 75 мкл буфера TE8 и добавляют равный

объем буфера для электрофореза (160 мМ трис-НСl, рН 6,8, 20% глицерина, 4% лоденцилсульфата натрия, 4 мМ ЭДТФ, 6% -меркаптоэтанола, 0,05% бромфенол-бензойного синего). Клеточные белки анализируются с помощью электрофореза в полиакриламидном геле по Лэммли (U. K. Lammli. Nature, vol.227, pp. 680-685, 1970). После окончания электрофореза белки в геле фиксируют и окрашивают кумасси ярко-голубым R-250.

Анализ полученных результатов показывает, что в результате действия лизоцима

происходит разрушение оболочки бактерии и высвобождение водорастворимых клеточных белков в среду, что проявляется в ослаблении мигрирующих белковых полос. В контроле, в случае использования плазмида рЕХ3, такого эффекта нет.

Таким образом, изобретение позволяет получать водорастворимые агломераты рекомбинантных белков без использования дополнительных методов разрушения клеточных стенок.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕГЕНИЯ

Вектор рЕЛ5с, предназначенный для экспрессии чужеродной ДНК, размером 6,4 т.п.о., содержащий XbaI-XbaI - фрагмент плазмидной ДНК бактериального вектора рЕХ3 размером 5,8 т.п.о., со сплитным сго-lacZ геном, кодирующим белок под контролем промотора Pr бактериофага лямбда, полилинкер в 3'-конце lacZ-гена; BamHI-BamHI-фрагмент ДНК плазмида рLysS с геном лизоцима бактериофага T4

размером 0,6 т.п.о.; уникальные сайты рестрикции для клонирования ДНК на 3'-конце гена LacZ: SmaI, BamH1, SalI, PstI; оператор Ок и промотор Pr бактериофага лямбда; терминаторы транскрипции фага fd; генетический маркер - устойчивость к ампциллину; спектр хозяев - бактерии Escherichia coli, с геном cts 857 бактериофага лямбда.

---

Заказ №  
ВНИИППИ, Рег. № 040720  
113834, ГСП, Москва, Раушская наб., 4/5

121873, Москва, Бережковская наб., 24 стр. 2.  
Производственное предприятие «Патент»